

Bi8920 Fluorescenční mikroskopie

Princip fluorescence

doc. RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PŘF MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Program přednášky:

- definice a princip fluorescence
- fluorochromy



„Viditelné“ světlo

elektromagnetické vlnění o vlnové délce 400-700 nm

elementární částice - foton

duální povaha - vlnová i částicová (dle metody studia)

vlnová délka (λ) – délka jednoho kmitu (400-700 nm)

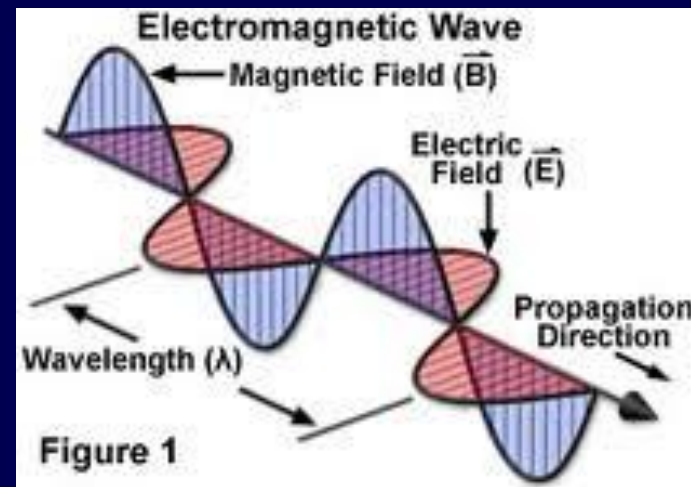
frekvence (f) – počet kmitů za sekundu ($4-8 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}$ [Hz])

rychlost světla (c) = konstantní ve vakuu ($300.000 \text{ km} \cdot \text{s}^{-1}$)

platí vztahy:

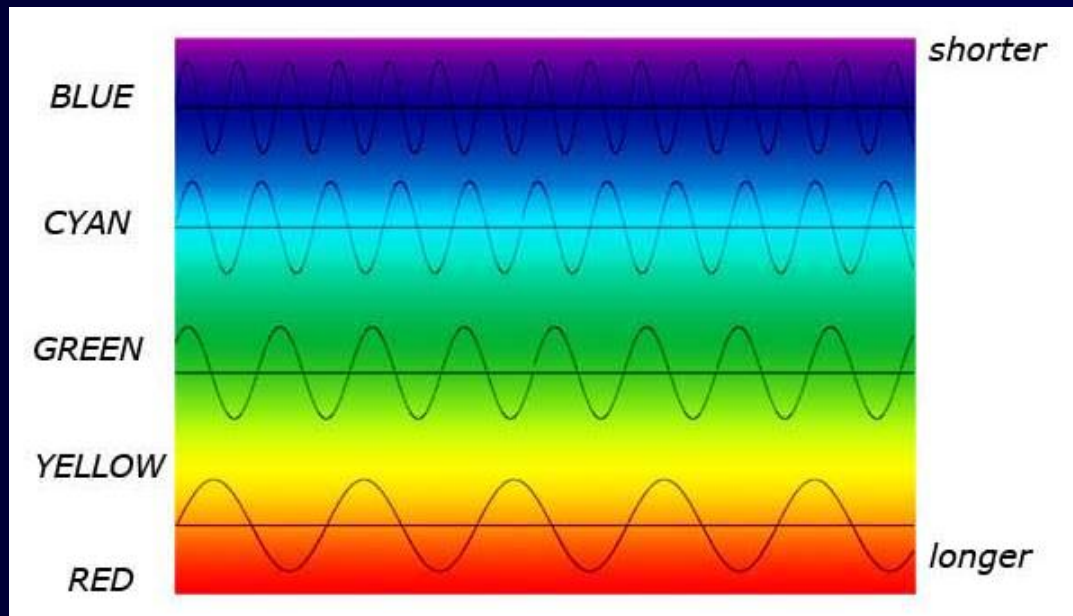
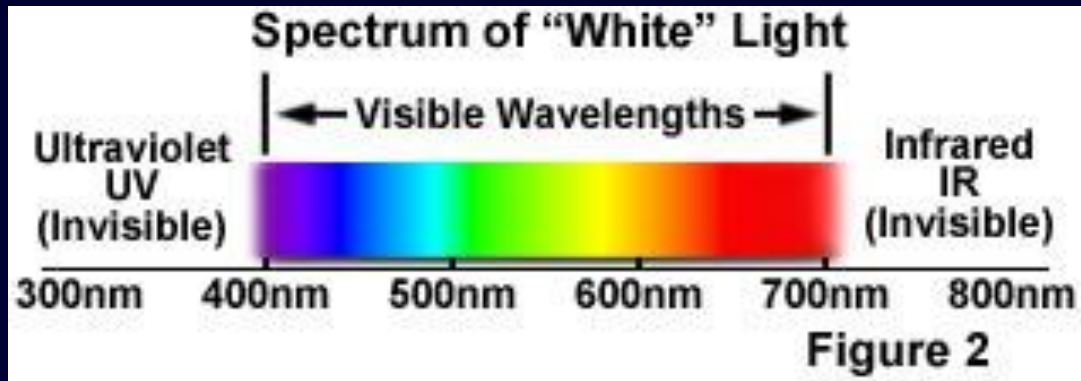
$$c = \lambda * f$$

$$E = h * f$$



Planckova konstanta $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

vlnová délka – barva světla



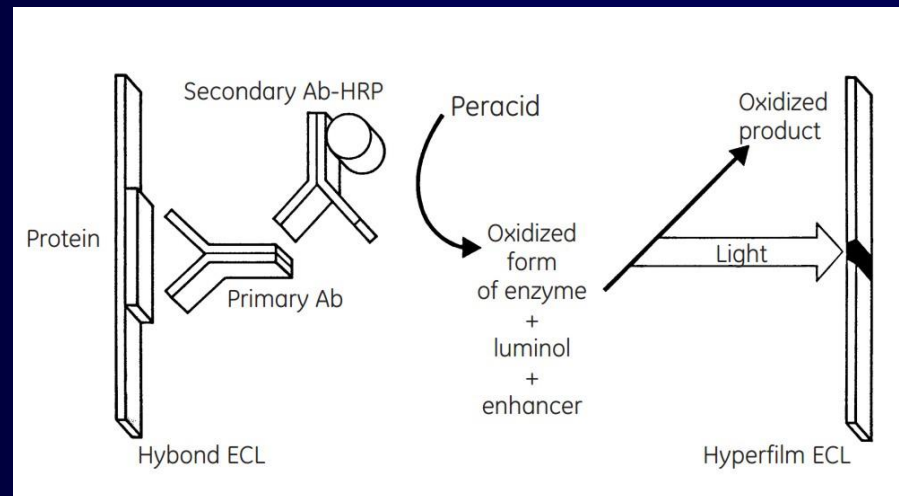
<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/java/wavebasics/index.html>

LUMINISCENCE

jev při kterém vysílá látka do prostoru světlo

dělení dle indukce

– **chemiluminiscence** : vyvoláno chemickou reakcí
např. oxidace luciferinu luciferázou u světlušky, ECL



-Fotoluminiscence

záření je vyvoláno jiným zářením

a) fluorescence

b) fosforescence

fluorochrom =
fluorofor

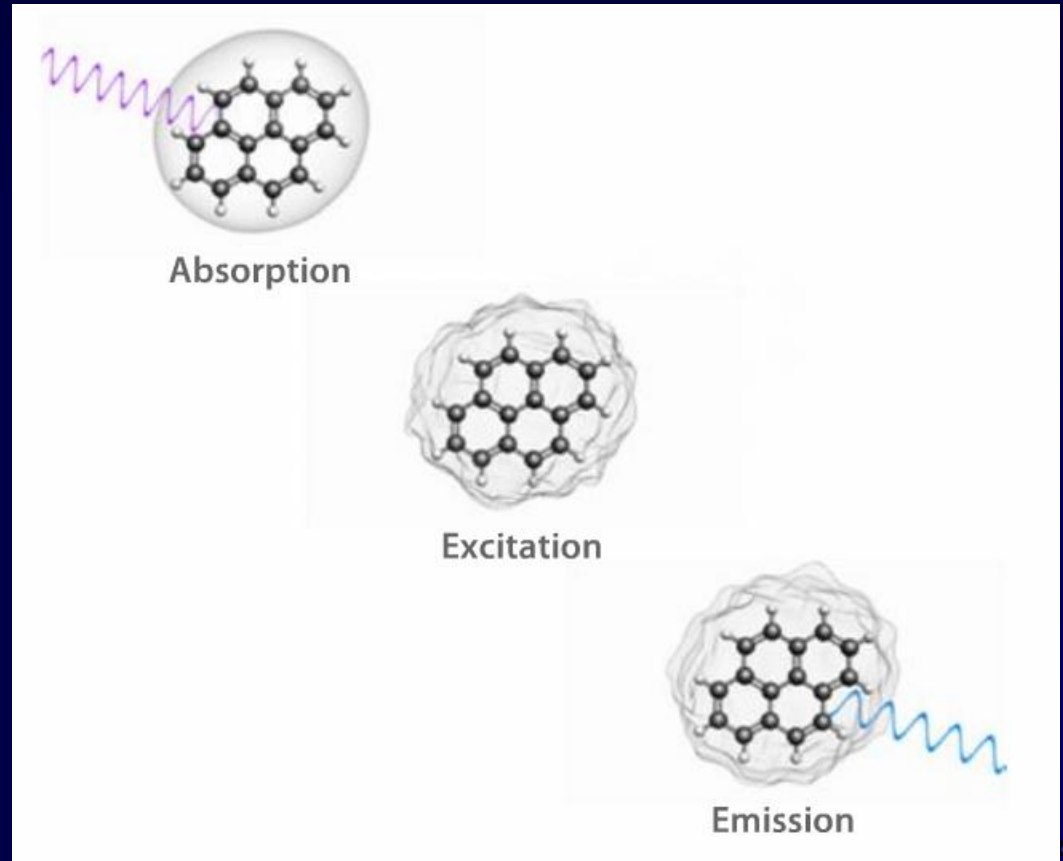
látka schopná
fluorescence

excitační záření

luminiscenci vyvolává

emisní záření

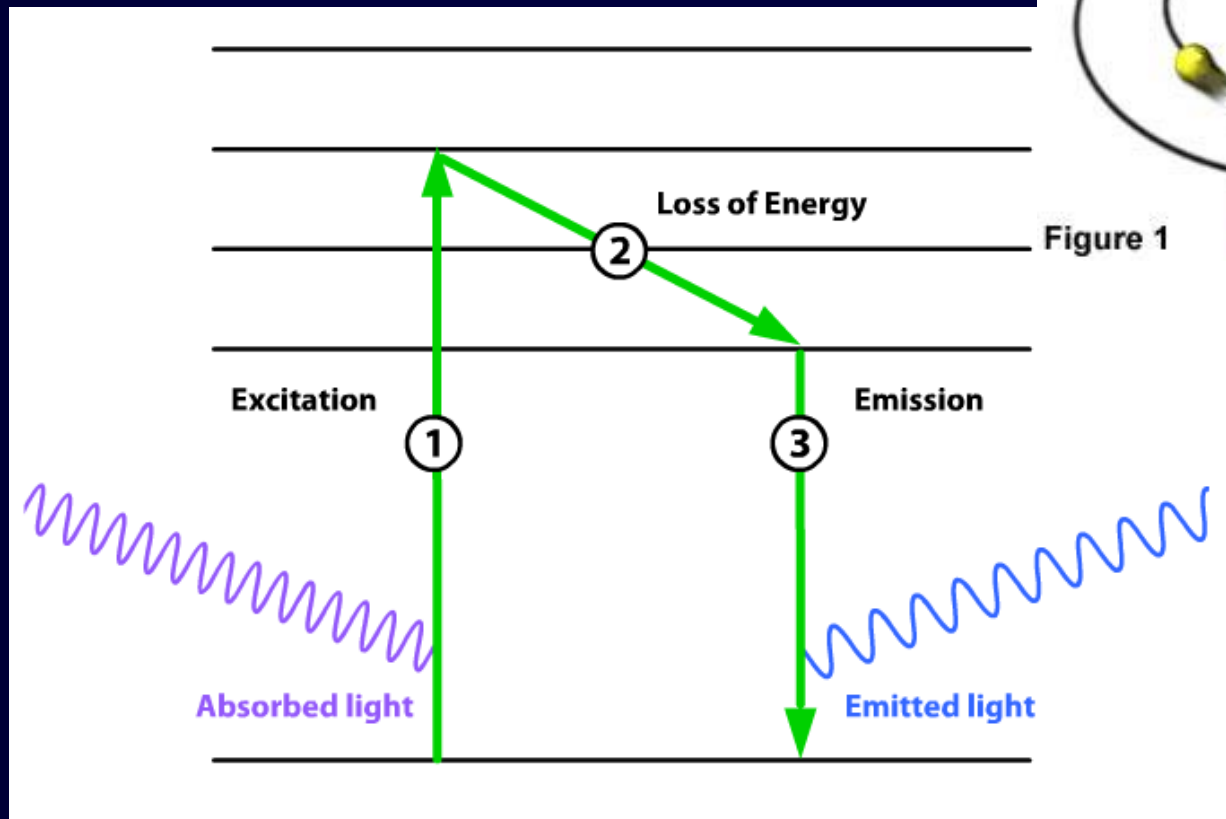
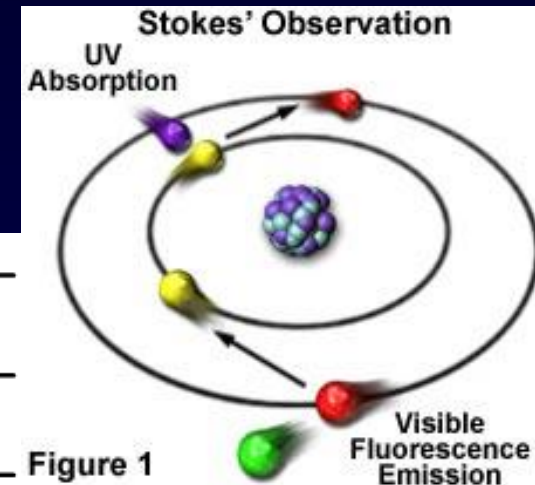
vysílané látkou



Podstata fluorescence Jablonskiho diagram

<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/java/fluorescence/exciteemit/index.html>

vyšší energetické hladiny



excitační
záření

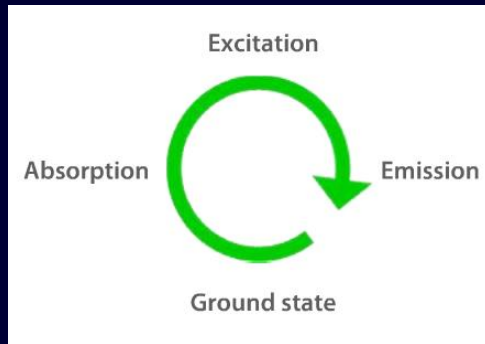
emisní
záření

základní energetická hladina

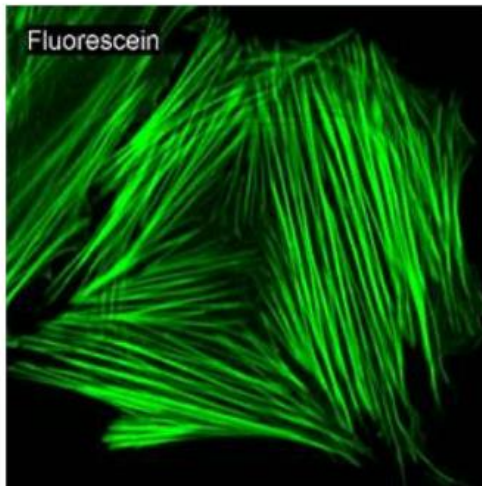
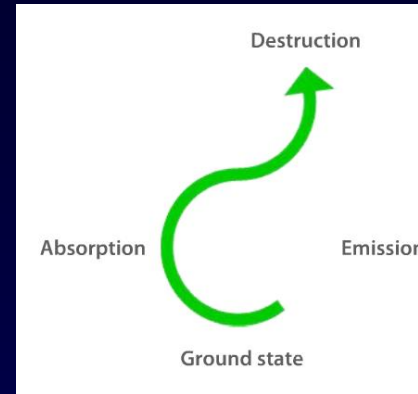
Průběh fluorescence

1. **excitace** elektronů fotony ze základní energetické hladiny do excitovaného stavu
trvání 10^{-15} s
2. **excitovaný stav**
pokles na nejnižší hladinu excitace (relaxace)
ztráta energie ve formě tepla
trvání $10^{-14} - 10^{-11}$ s
3. **emise** světla => fluorescence
trvání $10^{-7} - 10^{-9}$ s = doba dohasínání

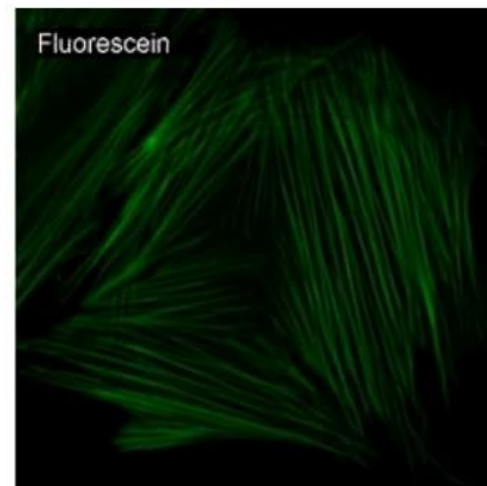
recyklace



photobleaching



Before



Photobleaching 13 sec

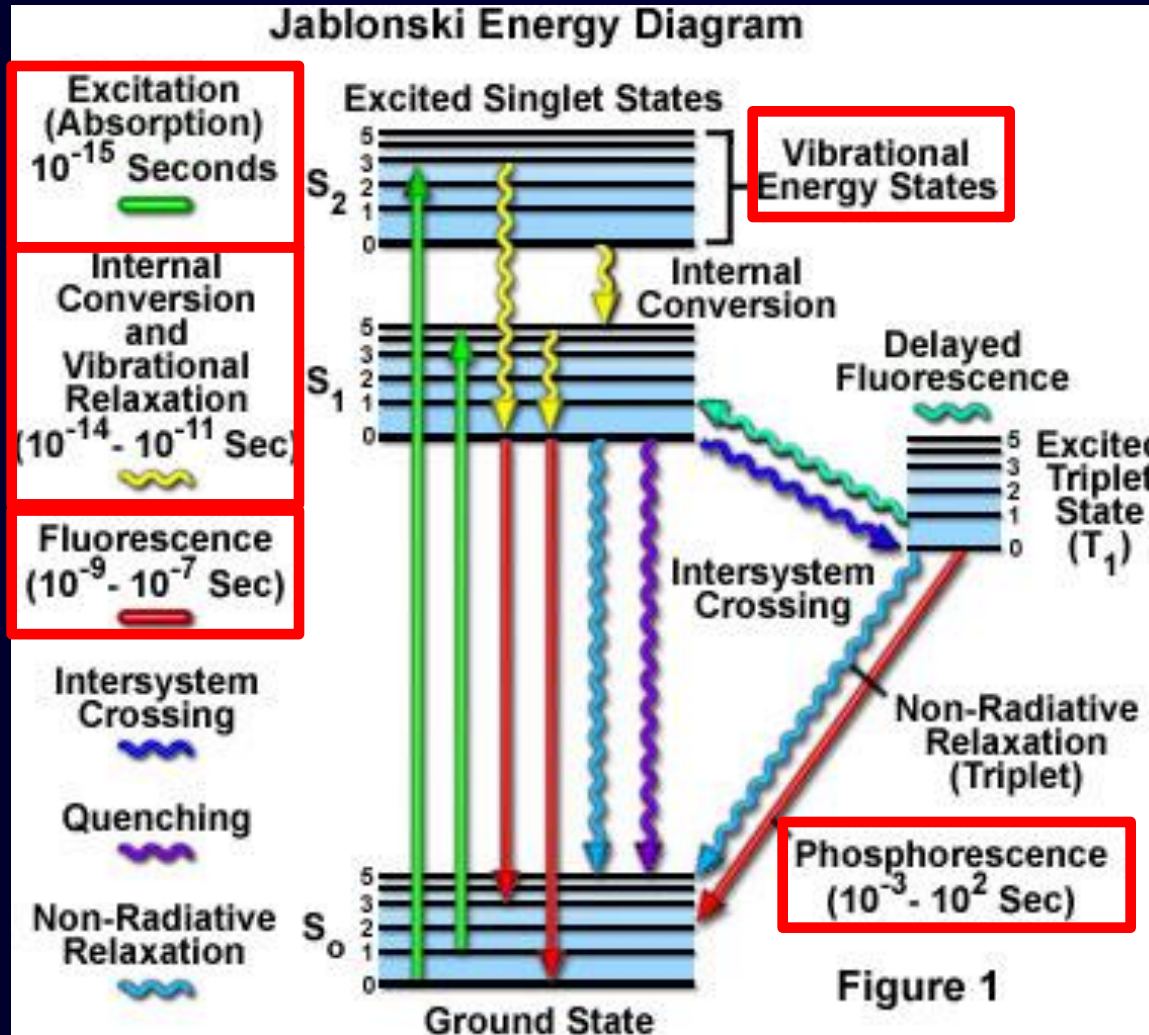
<http://www.olympusmicro.com/primer/java/fluorescence/photobleaching/index.html>

Princip fluorescence

<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/tutorials/1Intro/player.html>



Podstata fluorescence a fosforescence Jablonského diagram



fosforescence
doba dohasínání
 $10^{-3} - 10^2$ s

Jablonského diagram- zjednodušený

<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/lightandcolor/index.html>

Jablonského diagram

<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>

Spin je kvantová vlastnost elementárních částic - vnitřní moment hybnosti částice. Spiny částic přispívají k celkovému momentu hybnosti soustavy.

excitovaný singletový stav

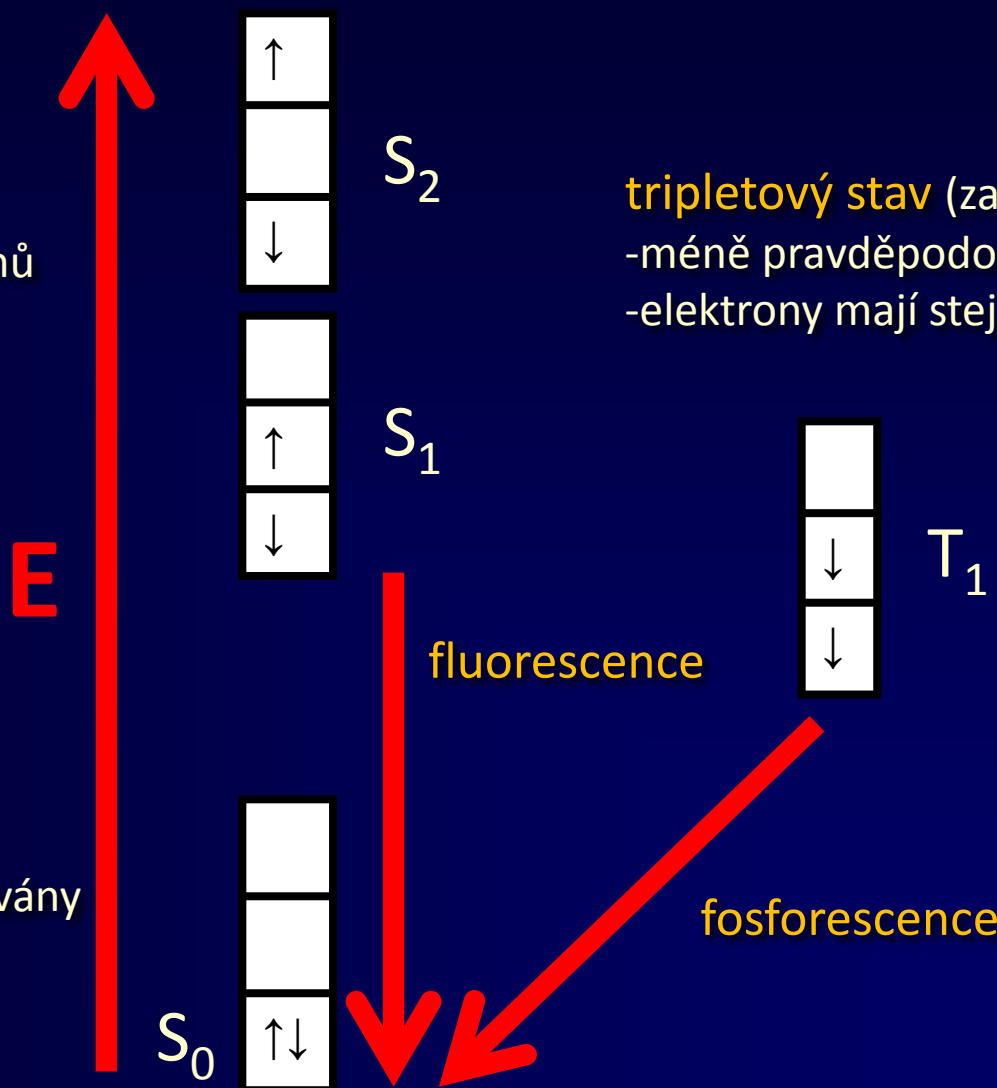
- elektrony obsazují vyšší energ. hladiny
- porušuje se párování elektronů na jednotlivých hladinách
- spin se při excitaci nemění

základní singletový stav

- všechny elektrony jsou spárovány
- mají opačný spin
- velikost $+1/2, -1/2$

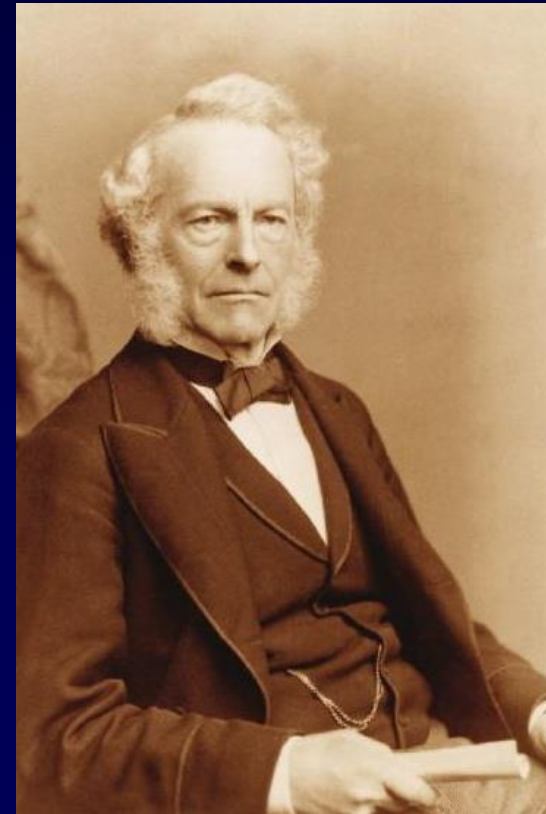
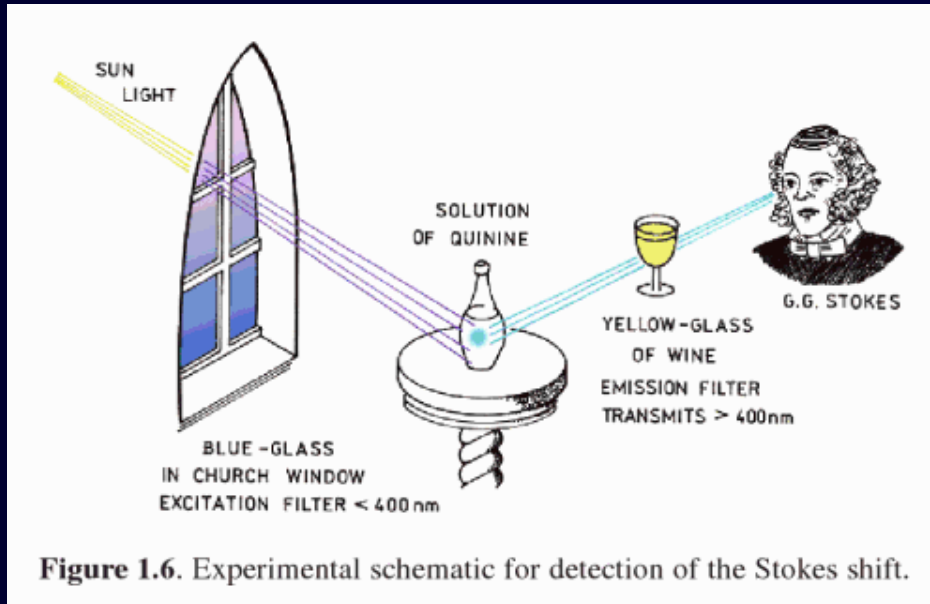
tripletový stav (zakázaný)

- méně pravděpodobný
- elektrony mají stejný spin



Stokesův posun

- V rámci relaxace v excitovaných stavech dochází ke ztrátě energie
- Energie excitujícího světla je větší než emitovaného ($E_{ex} > E_{em}$)
- Vlnová délka excitujícího světla je menší než emitovaného ($\lambda_{ex} < \lambda_{em}$)



Sir G.G. Stokes

On the Change of Refrangibility of Light. By G. G. Stokes, M.A., F.R.S., Fellow of Pembroke College, and Lucasian Professor of Mathematics in the University of Cambridge. Phil. Trans. Royal Society of London (1852) pp. 463-562. Received May 11, — Read May 27, 1852.

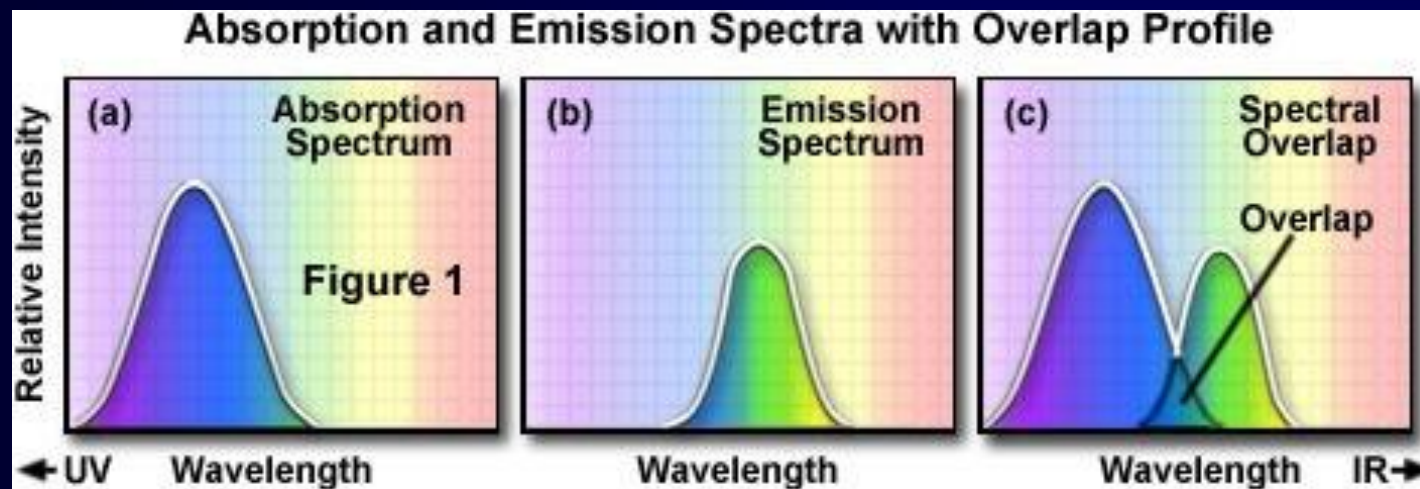


Absorbční (excitační) spektrum

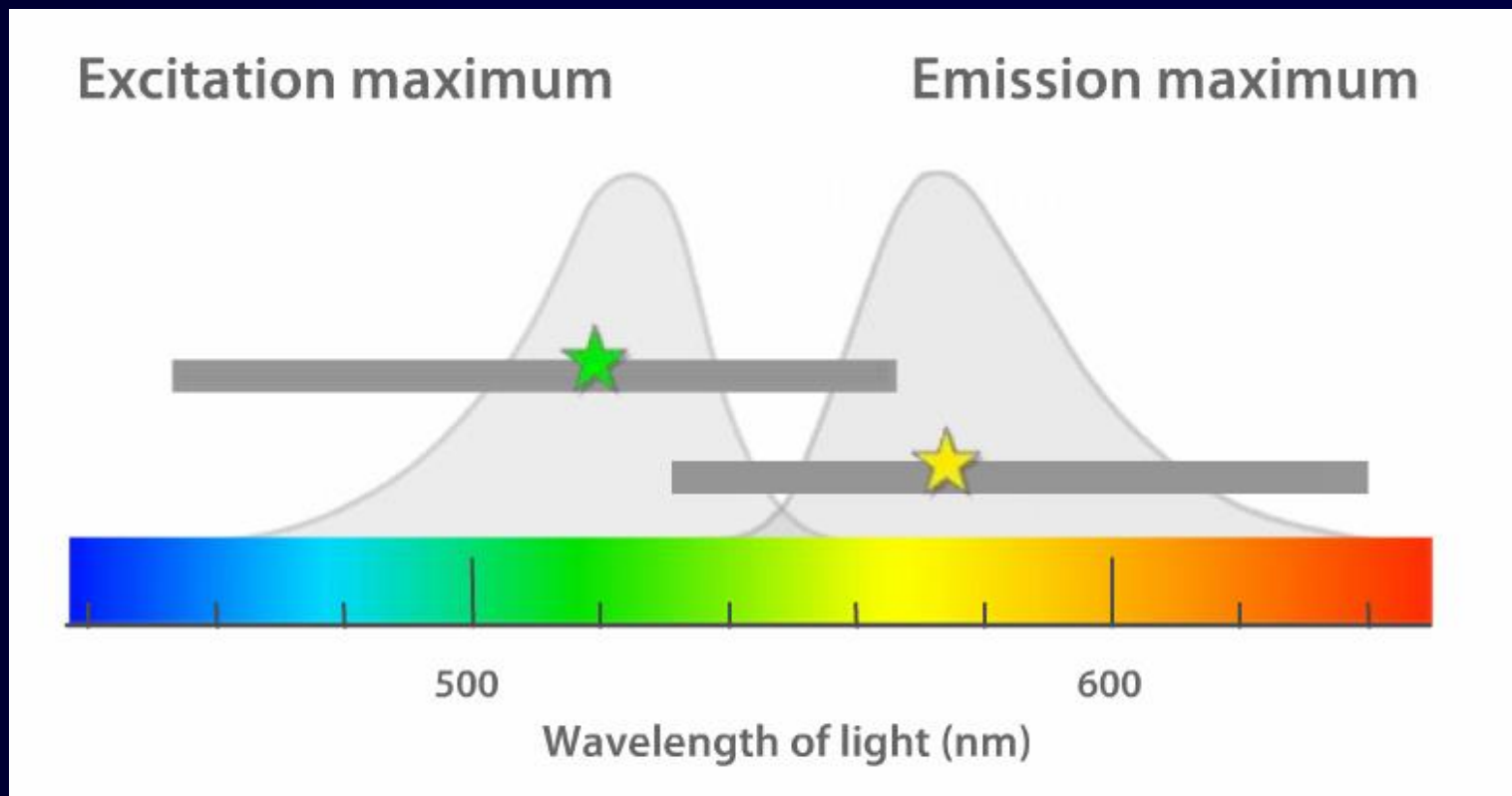
závislost intenzity fluorescence na excitační vlnové délce
(měřeno při konstantní emisní vlnové délce)

Emisní spektrum

závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při
konstantní vlnové délce excitace



- obě spektra mají své maxima
- excitační maximum
- emisní maximum
- vzdálenost mezi nimi – Stokesův posun



Emisní spektrum určitého fluorochromu

- je nezávislé na vlnové délce excitace
- emise z nejnižšího excitovaného stavu (S_1)
- mění se pouze intenzita fluorescence
- intenzita emisního spektra odpovídá amplitudě excitace

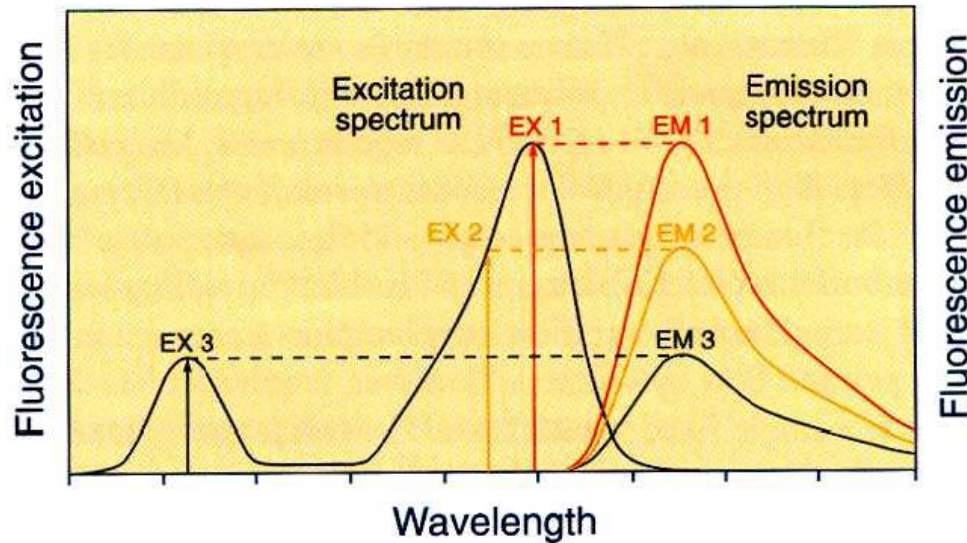
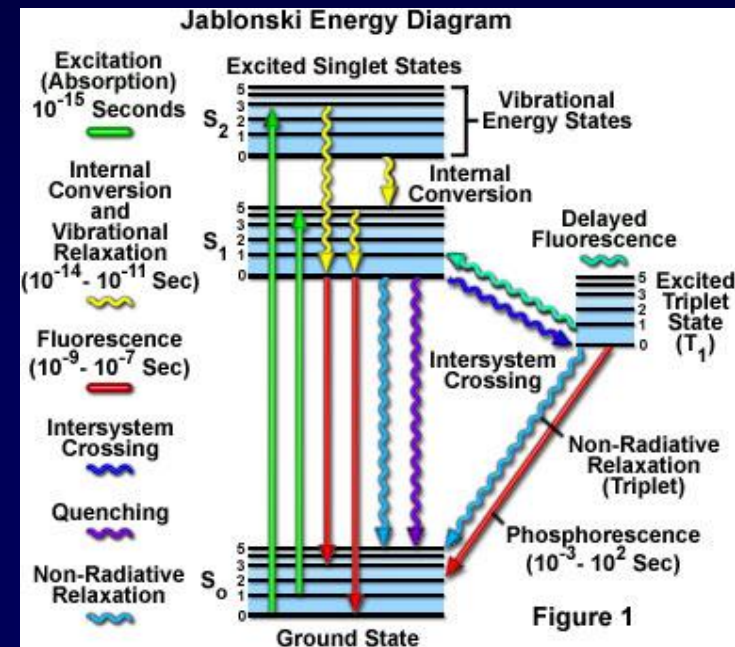
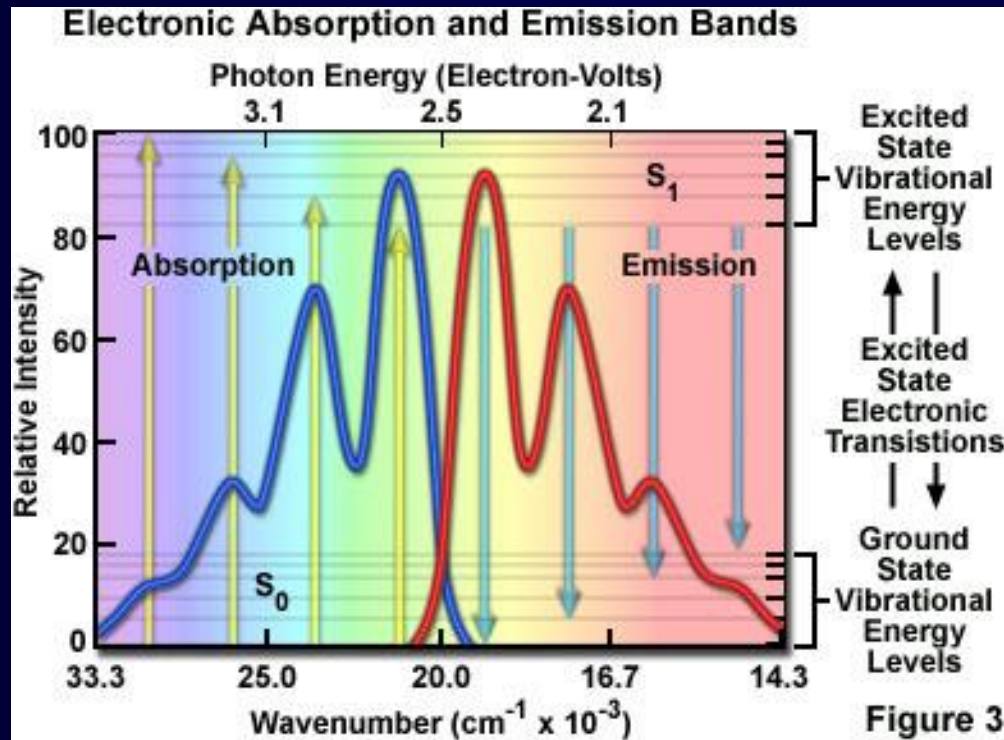


Figure 2. Excitation of a fluorophore at three different wavelengths (EX 1, EX 2, EX 3) does not change the emission profile but does produce variations in fluorescence emission intensity (EM 1, EM 2, EM 3) that correspond to the amplitude of the excitation spectrum.



Symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem

- struktura vibračních hladin základního i excitovaných stavů je stejná
- absorpce (excitace) a emise do odpovídajících hladin nastává se stejnou pravděpodobností
- absorpční a emisní spektra zrcadlově symetrická



Excitační a emisní spektrum

<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/tutorials/2Spectra/player.html>



Molární extinkční koeficient (molární absorptivita)

- vyjadřuje míru schopnosti látky absorbovat světlo

Lambert-Beerův zákon

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

- A – absorbance (bez jednotek)
- ε – molární extinkční koeficient ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- c – molární koncentrace ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- l – dráha (cm)

Kvantový výtěžek fluorescence (Quantum Yield = QY)

$$QY = \frac{\text{počet emitovaných fotonů}}{\text{počet absorbovaných fotonů}}$$

- vyjadřuje míru schopnosti excitačního vlnění vyvolat fluorescenci
- maximálně = 1 (teoreticky; energetické ztráty)



Standards pro určení kvantového výtěžku fluorescence

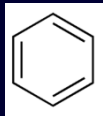
Quantum Yield [Q.Y.] Standards	Q.Y. [%]	Conditions for Q.Y. Measurement	Excitation [nm]
Cy3	4	PBS	540
Cy5	27	PBS	620
Cresyl Violet	53	Methanol	580
Fluorescein	95	0.1 M NaOH, 22°C	496
POPOP	97	Cyclohexane	300
Quinine Sulfate	58	0.1 M H ₂ SO ₄ , 22°C	350
Rhodamine 101	100	Ethanol	450
Rhodamine 6G	95	Water	488
Rhodamine B	31	Water	514
Tryptophan	13	Water, 20°C	280
L-Tyrosine	14	Water	275

fluorochrom = fluorofor

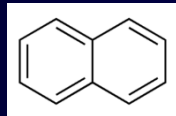
látka schopná fluorescence

- často obsahuje polycyklické nenasycené sloučeniny a atomy (s více elektrony – např. P, S)
- čím více benzenových jader, tím více roste absorpční maximum

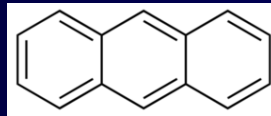
benzen
262 nm



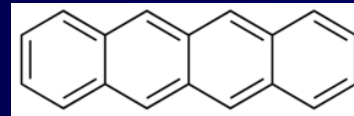
naftalen
272 nm



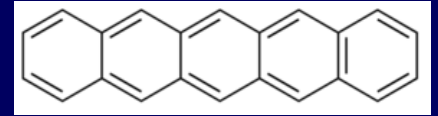
antracen
375nm



tetracen
475nm



pentacen
580nm



Skupiny fluoroforů

Vlastní (vnitřní) fluorescence

Přirozeně se vyskytující fluorofory
aminokyseliny, kofaktory enzymů, chlorofyl,
green fluorescent protein..

Nevlastní (vnější) fluorescence

Přímá vazba fluorochromu na molekuly nebo buněčné
struktury - **sondy**

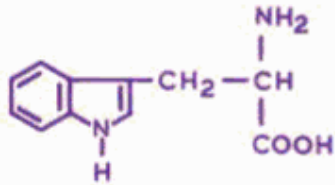
DNA, buněčná stěna, plazmatická membrána...
mitochondriální aktivita - respirační vzplanutí, pH indikátory,
membránový potenciál..

Nepřímá vazba fluorochromu – **značky**

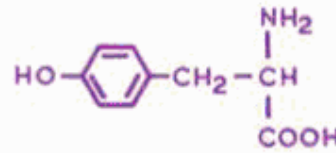
navázání na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové
kyseliny, phalloidin..



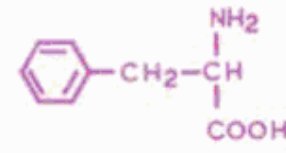
Přirozeně se vyskytující fluorofory - aminokyseliny



Tryptophan



Tyrosine



Phenylalanine

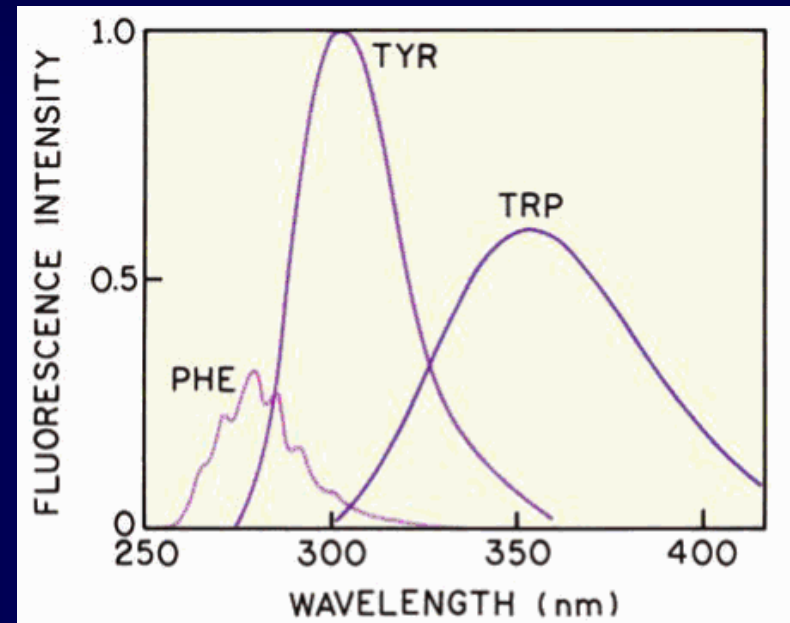
hlavní zdroj fluorescence proteinů v UV spektru

-indolová skupina Trp

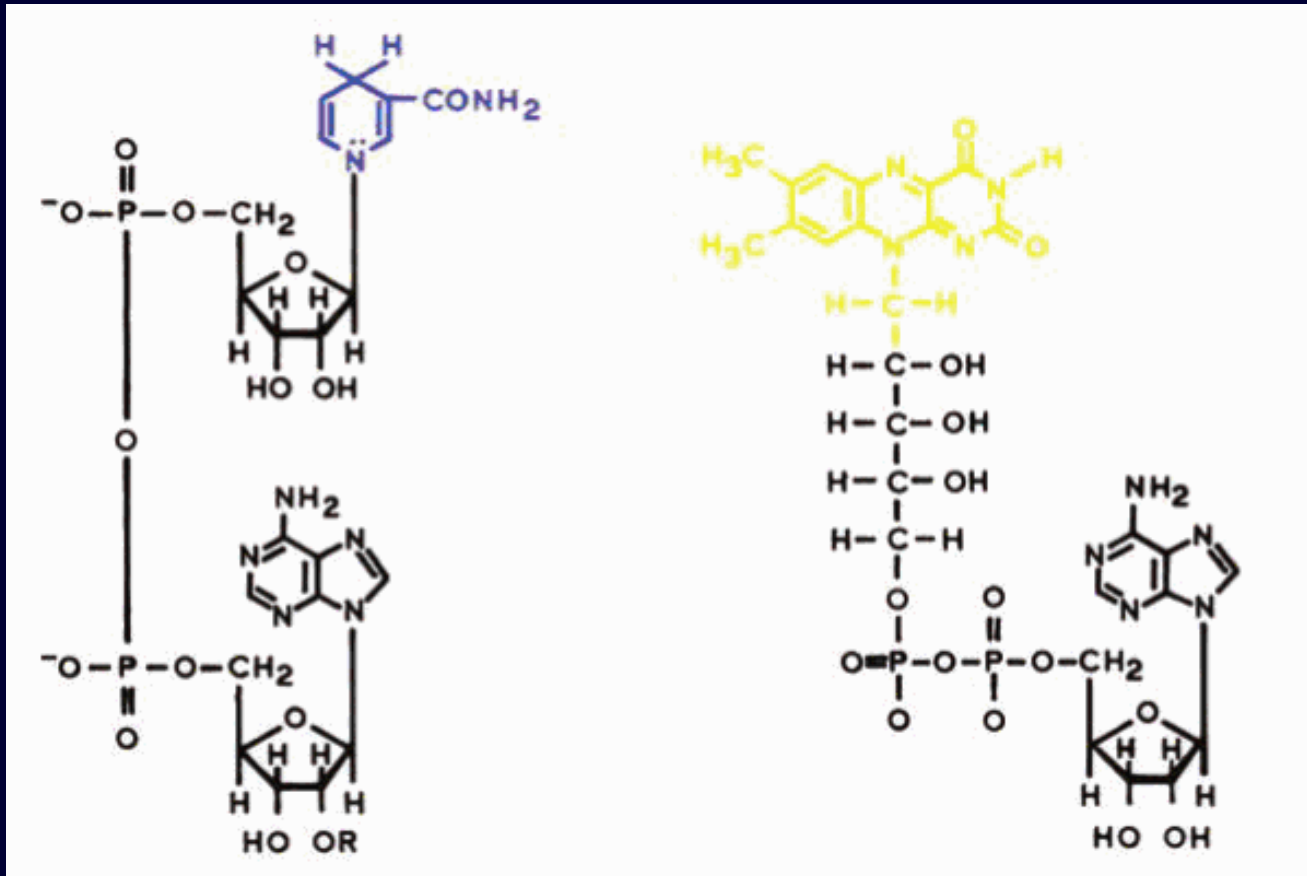
Trp v sekvencích jen 1%
metabolicky náročná syntéza

Table 2: fluorescent properties of some amino acids

amino acid	Lifetime (Nanoseconds)	Excitation		Emission	
		Wavelength	Molar absorptivity	Wavelength	Quantum yield
Tryptophan	2.6	280	5,600	348	0.20
Tyrosine	3.6	274	1,400	303	0.14
Phenylalanine	6.4	257	200	282	0.04



Přirozeně se vyskytující fluorofory - kofaktory

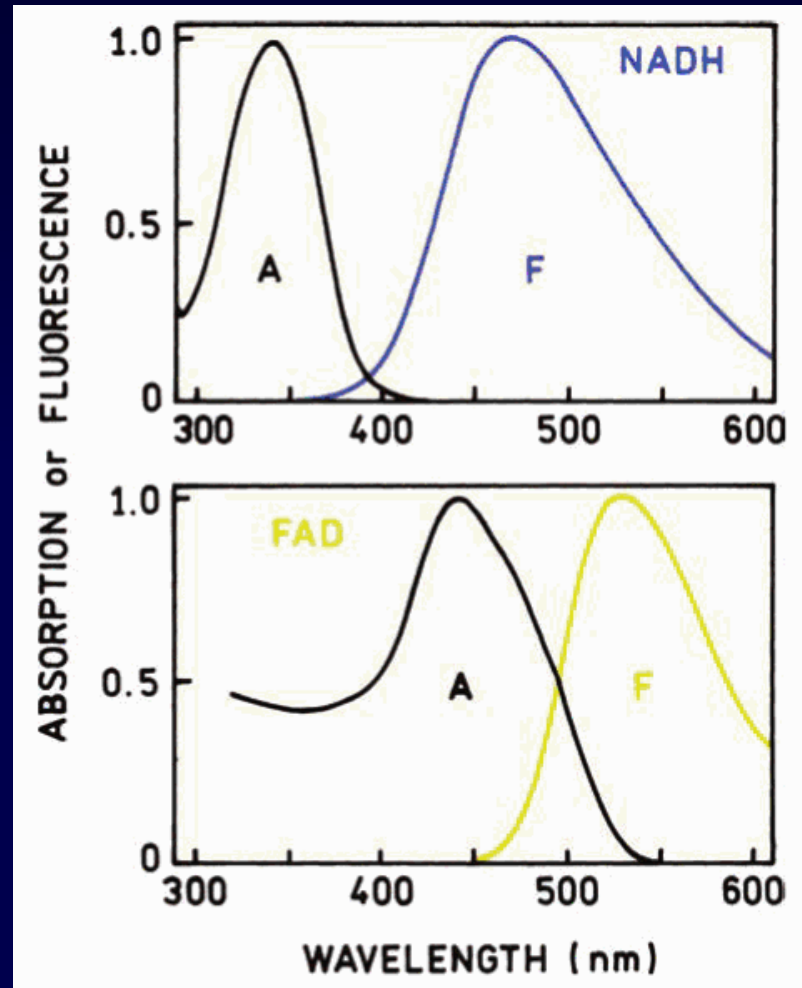
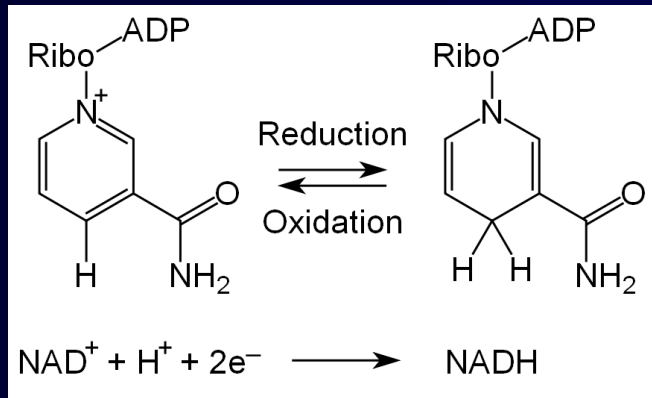


Nikotinamid adenin
dinukleotid (NADH)

Flavin adenin
dinukleotid (FAD)

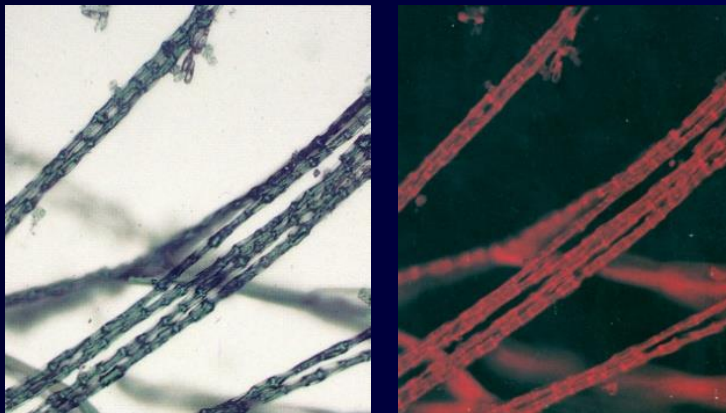
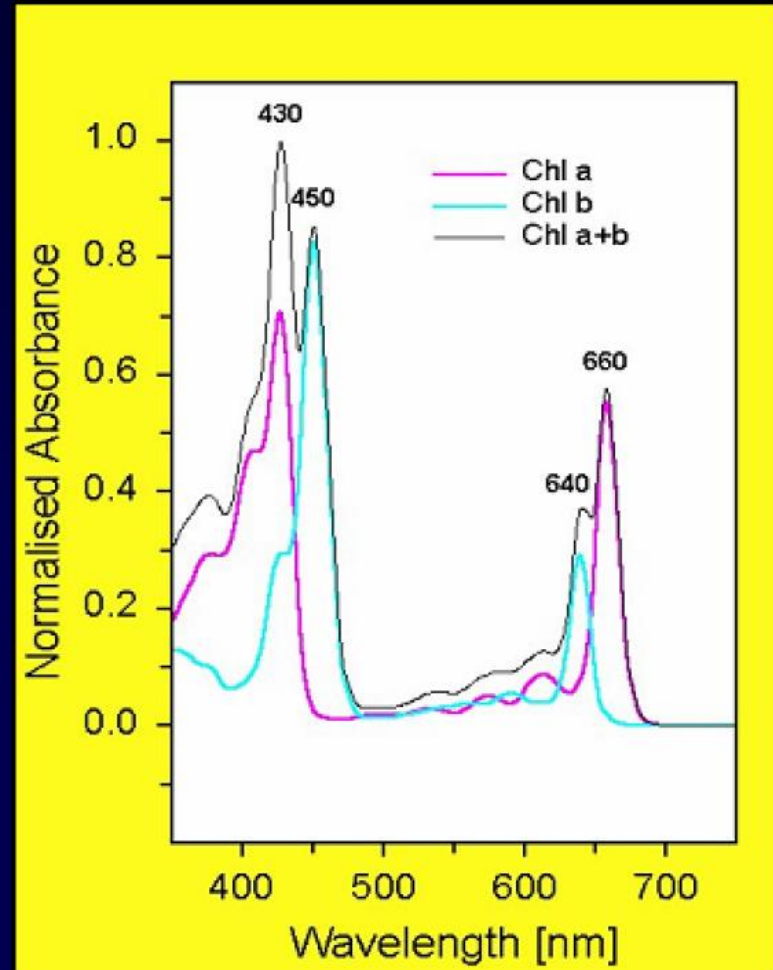
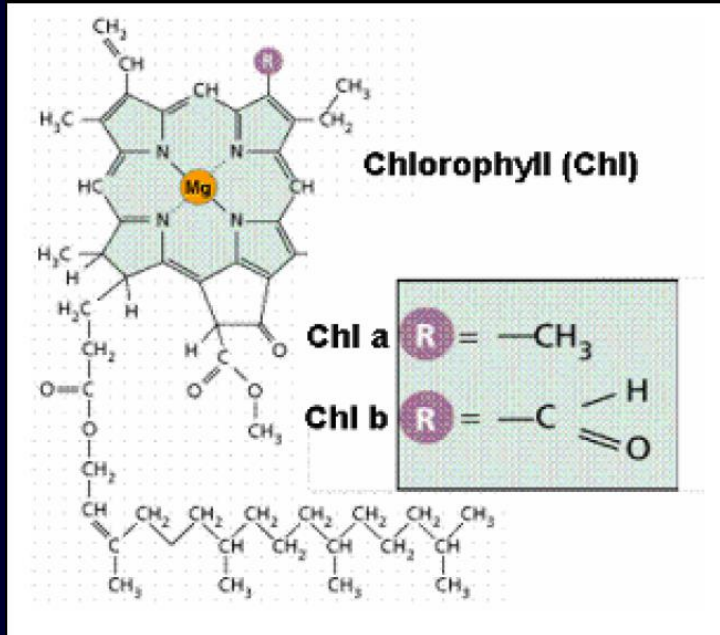
Přirozeně se vyskytující fluorofory - kofaktory

- NAD^+ není fluorescenční
- fluorochrom = redukovaný nikotinamidový ring



Přirozeně se vyskytující fluorofory – chlorofyl

- porfyrinové jádro + Mg

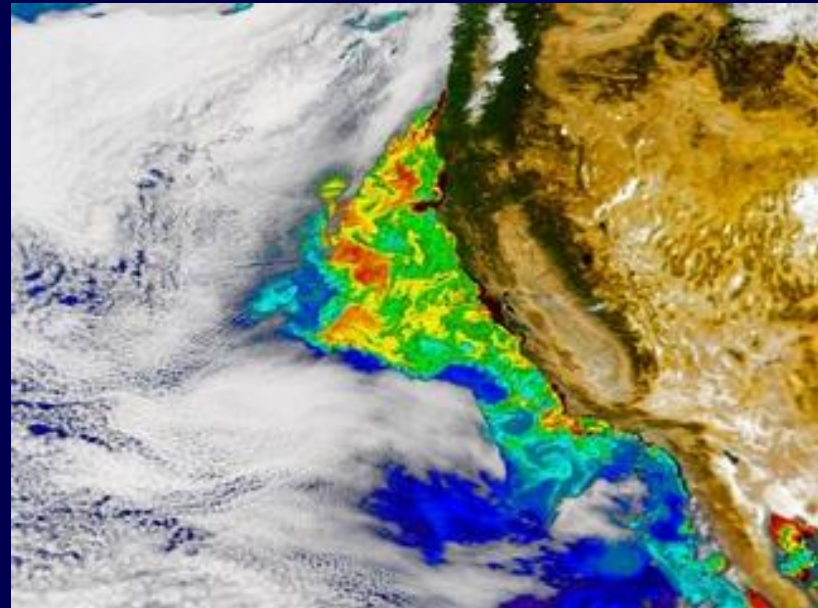
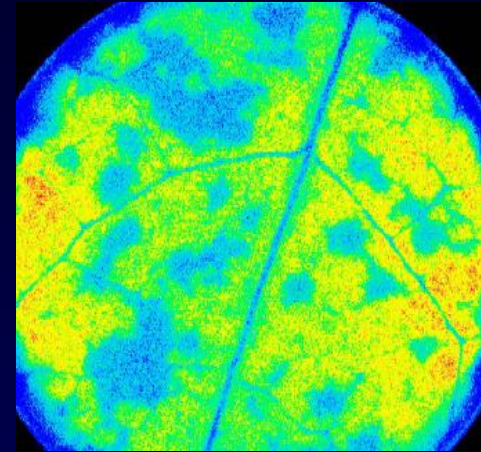


Stokesův posun až 200nm

Přirozeně se vyskytující fluorofory – chlorofyl

využití:

- hodnocení výskytu fytoplanktonu ve vodě
- studium fotosyntézy
- fyziologický stav rostlin - stres



Nevlastní (vnější) fluorescence

Nepřímá vazba fluorochromu – ZNAČKY

značky jsou vázány k molekulám (proteiny, peptidy, oligonukleotidy..) **kovalentní vazbou**

proteiny – vazba na aminové (NH_2 -), thiolové (SH-) skupiny nebo histidinové řetězce

požadavky

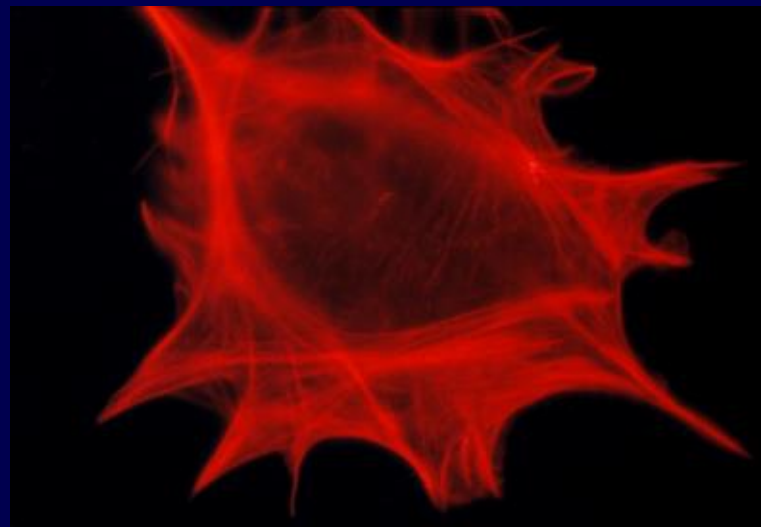
- vysoká intenzita fluorescence
- stabilita při ozařování
- minimální vliv na biologické vlastnosti vzorku

Rhodaminy

- historicky nejpoužívanější fluorescenční značky
- převážně na protilátky
- ve formě derivátů
- vysoký kvantový výtěžek 0,3-0,8
- photobleaching

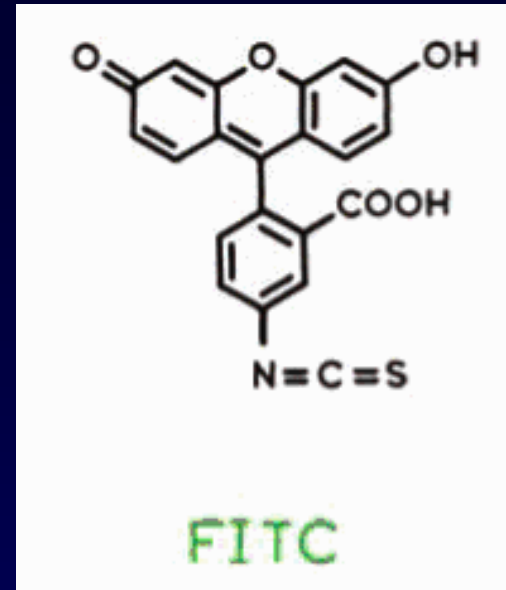
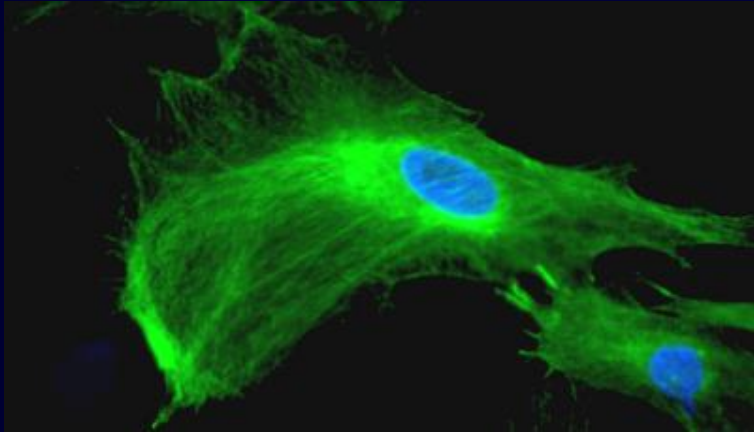
tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)

ex. – 541nm, em. – 572nm



Fluorescein isothiocyanate (FITC)

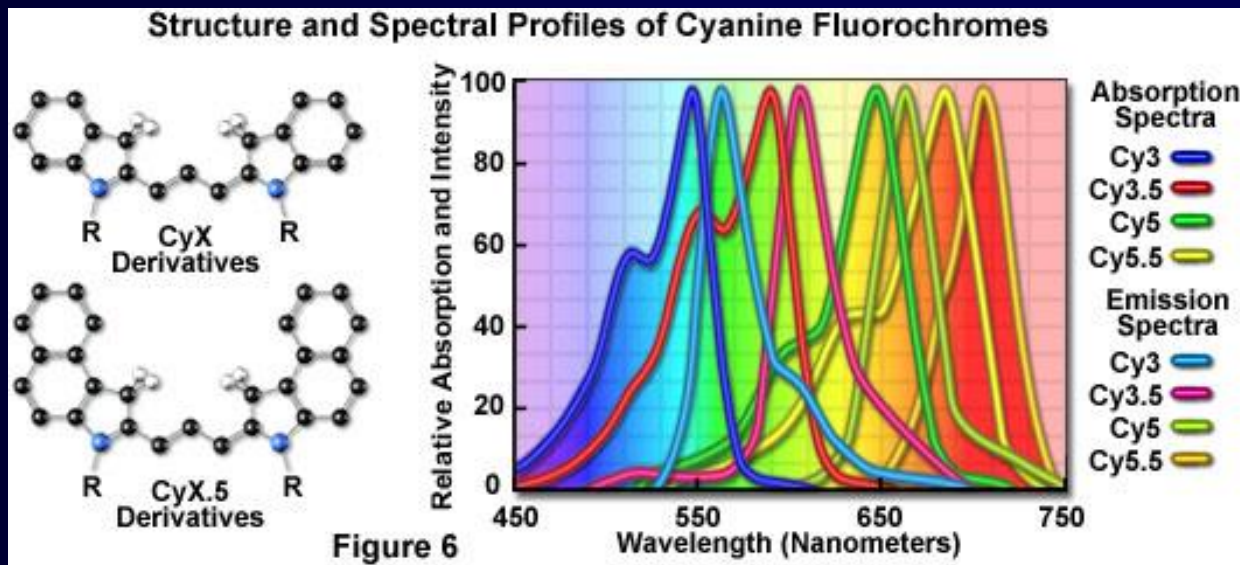
ex. - 495 nm, em. - 521 nm



Chicago river
St. Patrick's Day
fluorescein

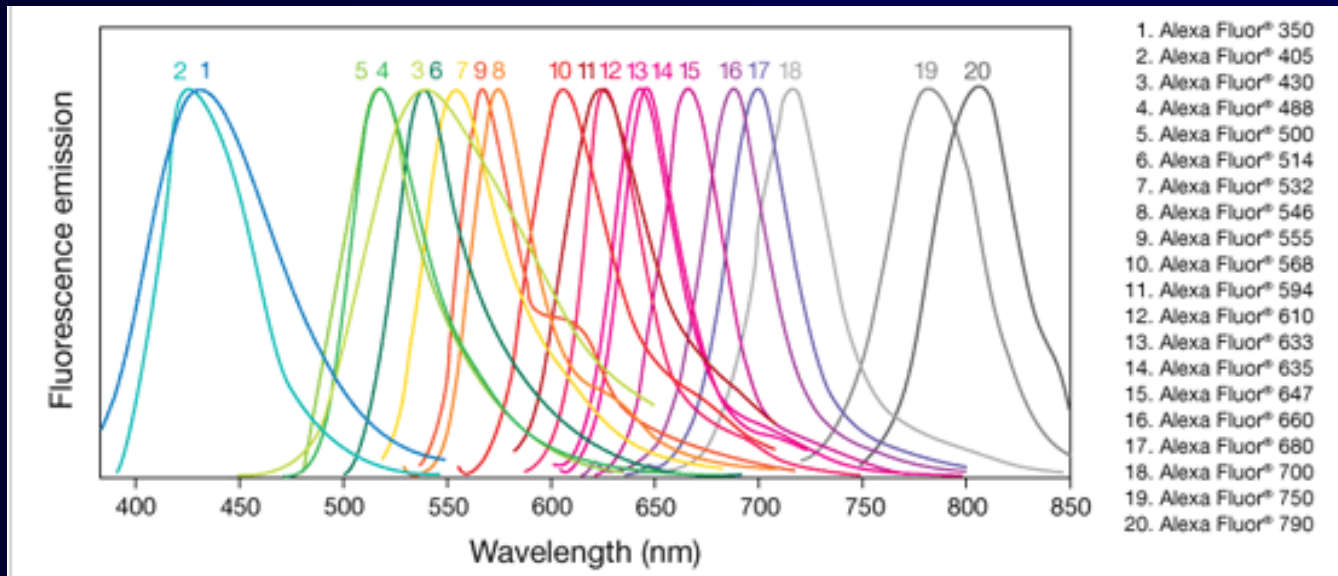
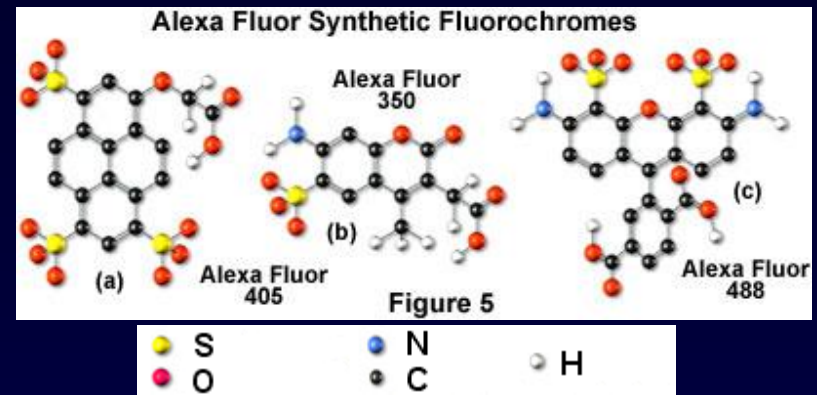
Cy značky (Cyanine dyes)

- zástupci Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7
- částečně nasycené heterocykly + další aromatická jádra
- ex. a em. spektra podobná klasickým fluoroforům
- kratší Stokesův posun (~30nm)
- fotostabilní
- vyšší kvantový výtěžek



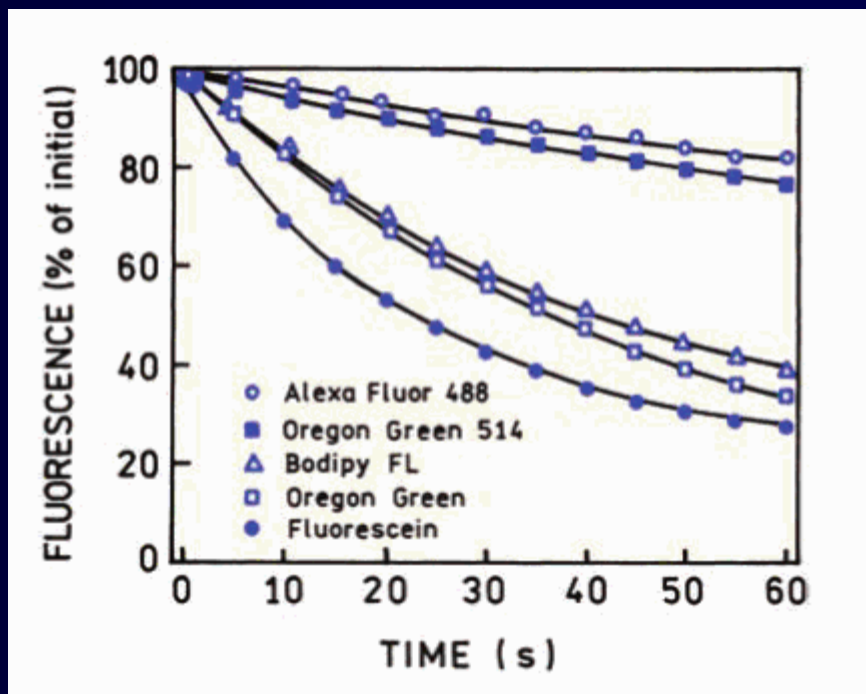
Alexa Fluor Dyes (Molecular Probes)

- sulfonovaný derivát rhodaminu
- vyšší kvantový výtěžek ~ svítivost
- zesílená fotostabilita (↓ photobleaching)
- pH stabilita
- dlouhodobě stabilní
- využití – živé buňky, tkáňové řezy, fixované preparáty
- velký výběr rozsahu ex. a em. maxim
- od UV po near-infrared oblast
- označení podle vlnové délky zdroje excitačního záření



Fotostabilita fluorochromů

- každý fluorofor podléhá vysvícení v průběhu souvislého osvětlení
- ve FM silná intenzita dopadajícího záření
- nejstabilnější – značky Alexa
- není znám princip předpovědi stability dle struktury



Quantum dots

- fluorofory (značky) = po absorpci fotonů emitují světlo o větší vlnové délce
- anorganické nanokrystaly
- velikost 10-20nm (GFP 4,2 x 2,4 nm)

složení:

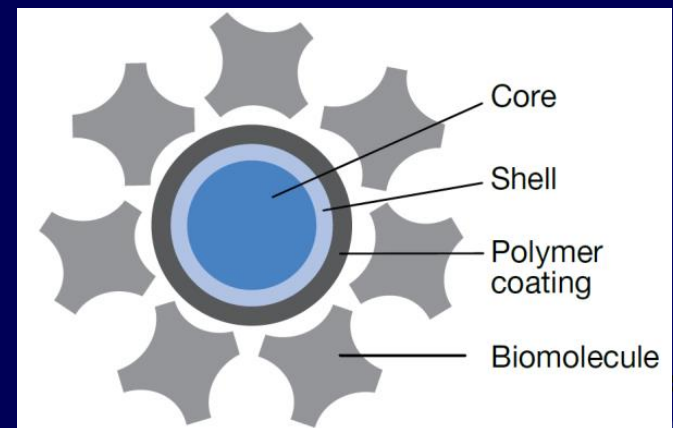
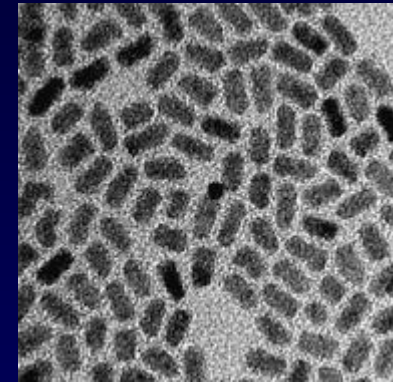
jádro: několik 100x-1000x molekul

polovodičového materiálu (Cd, Se, Te)

obal: polovodič (ZnS), stabilizuje jádro, zlepšuje optické a fyzikální vlastnosti

plášť: amfifilní polymer, umožňuje vazbu dalších molekul

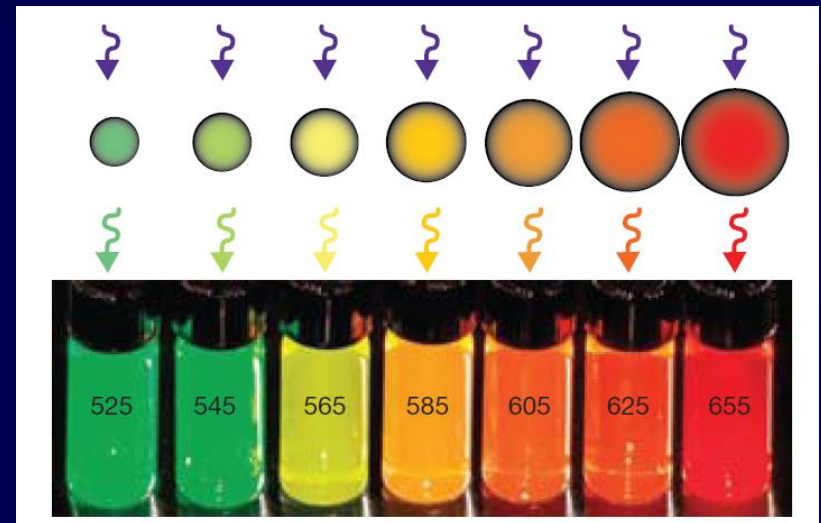
vnější plášť: polyethylene glycol (PEG) – snižuje nespecifickou vazbu



Quantum dots

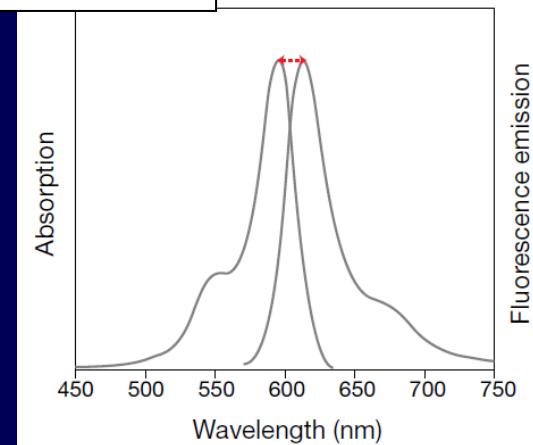
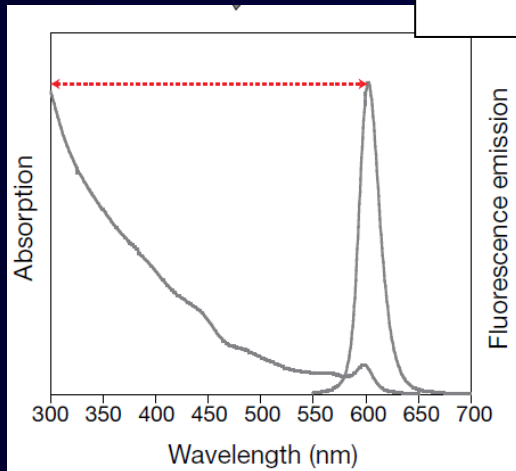
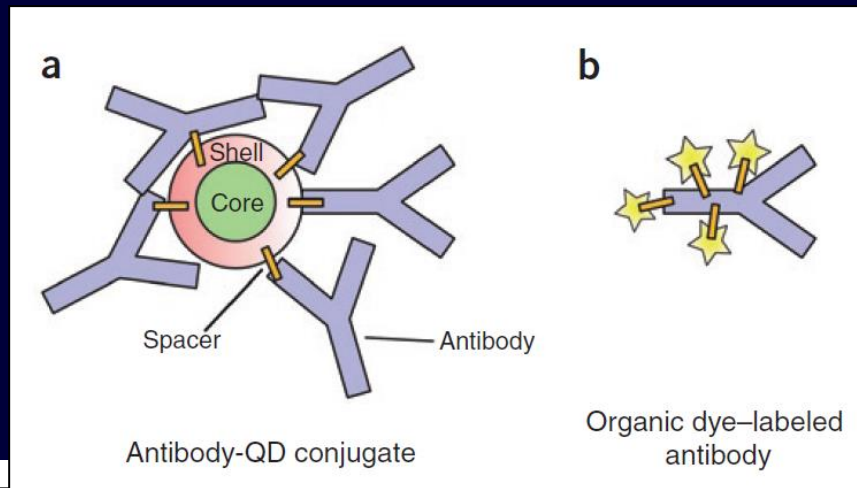
Vlastnosti:

- vlnová délka emise závisí na velikosti částice
- umožňují vícebarevnou detekci jedním excitačním zdrojem
- možnost konjugace s primárními i sekundárními protilátkami nebo streptavidinem
- více molekul IgG na jednu částici
- vyšší jas než klasické fluorofory
- násobně vyšší stabilita
- velký Stokesův shift



Quantum dots

- vazba na protilátku – srovnání s „klasickým“ konjugátem



Nevlastní (vnější) fluorescence

Přímá vazba fluorochromu na molekuly nebo buněčné struktury – **SONDY**

- ke struktuře se **váží nekovalentně**
- po vazbě často mění fluorescenční vlastnosti
- zesílení fluorescence

nejčastější použití

- buněčné membrány
- nukleové kyseliny
- buněčná stěna (calcofluor, primulin)
- **Fluorescenční indikátory**
změna fluorescence (spektra nebo intenzity) v závislosti na určité látce – prvek, pH, ROS...



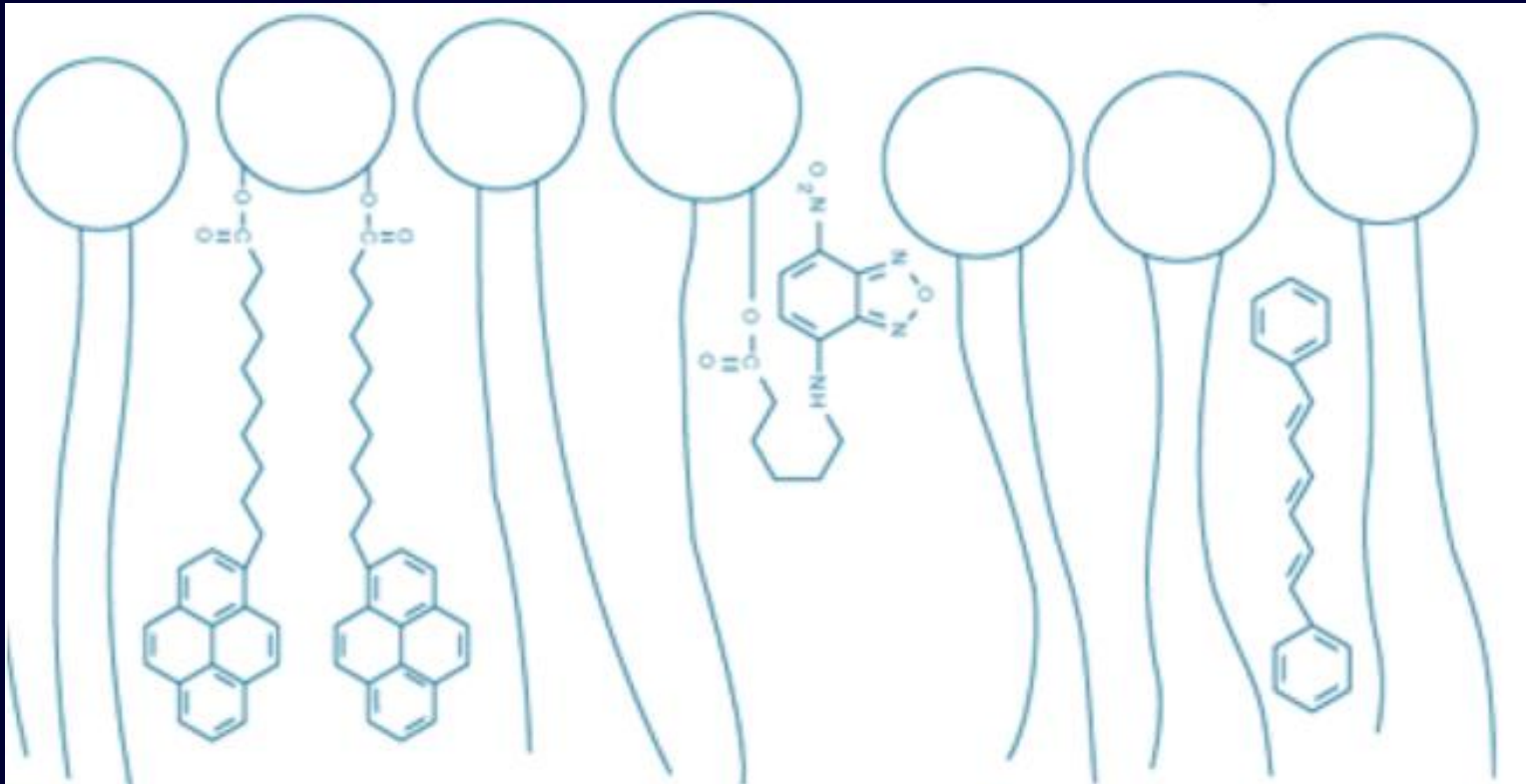
Mebránové fluorescenční sondy

- membrány nejsou samy o sobě fluorescenční
- vazba sond na nepolární uhlovodíkové řetězce MK
- **studium**
 - transportu přes membránu
 - transport lipidů v buňkách
 - přenos signálů zprostředkovaný lipidy
 - interakce léčiv s membránou
- **rozdělení**
 - a) fluorescenční analogy přirozených lipidů
 - a) malé amfifilní a lipofilní organické fluorofory



Mebránové fluorescenční sondy

Příklady a umístění fluorescenčních lipidových sond v membráně



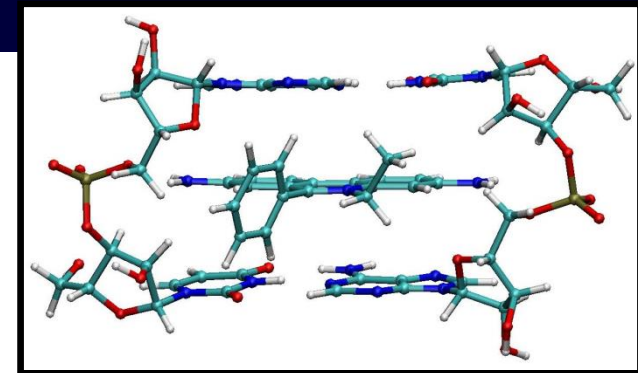
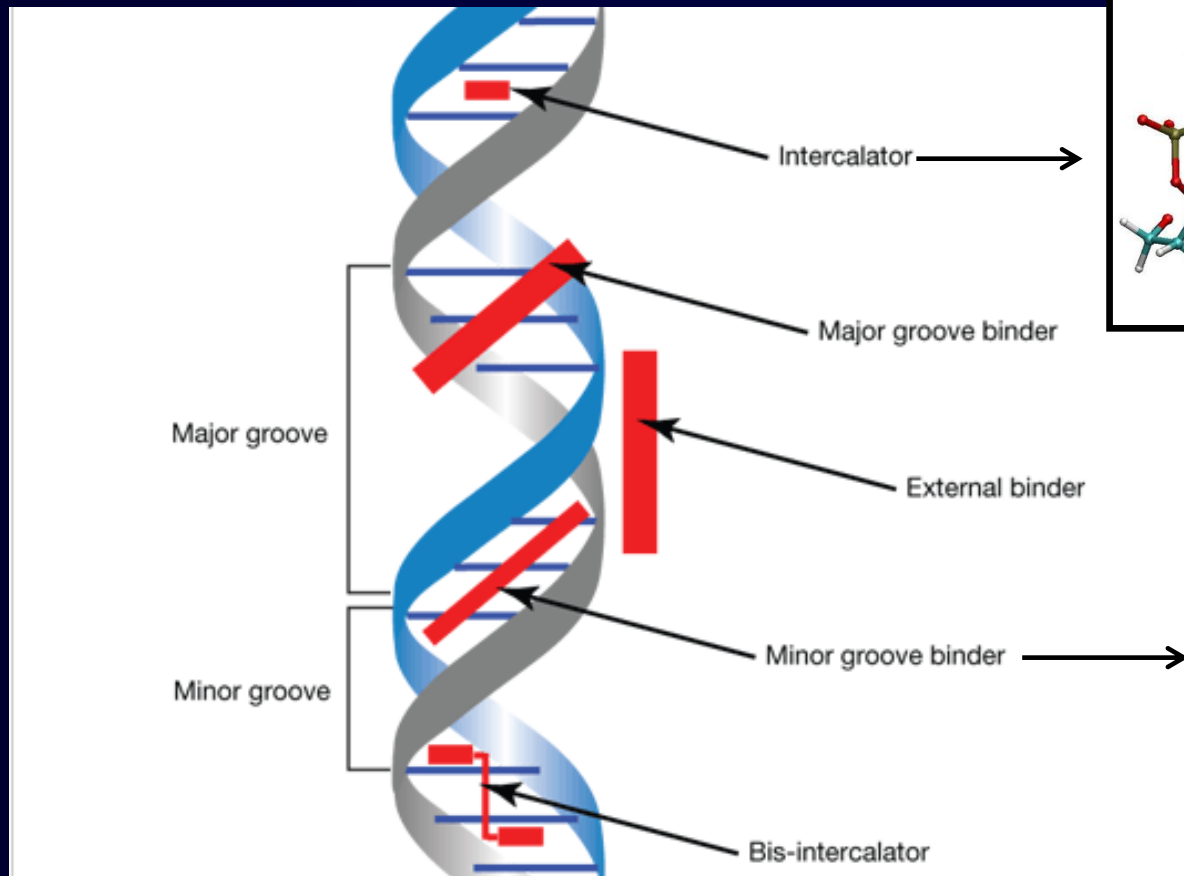
bis-pyren-PC

NBD-C₆-HPC

DPH

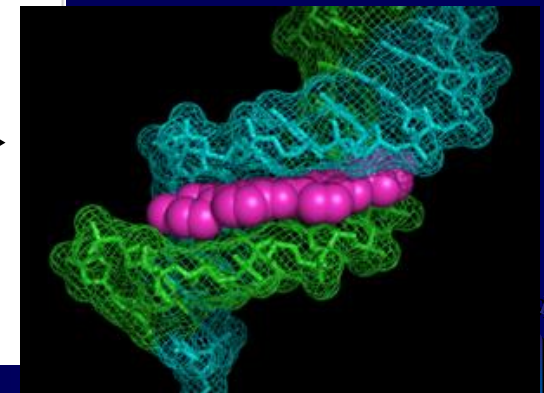
Fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny

- nukleotidy ani NK nemají schopnost fluorescence
- vazba sond na různá místa

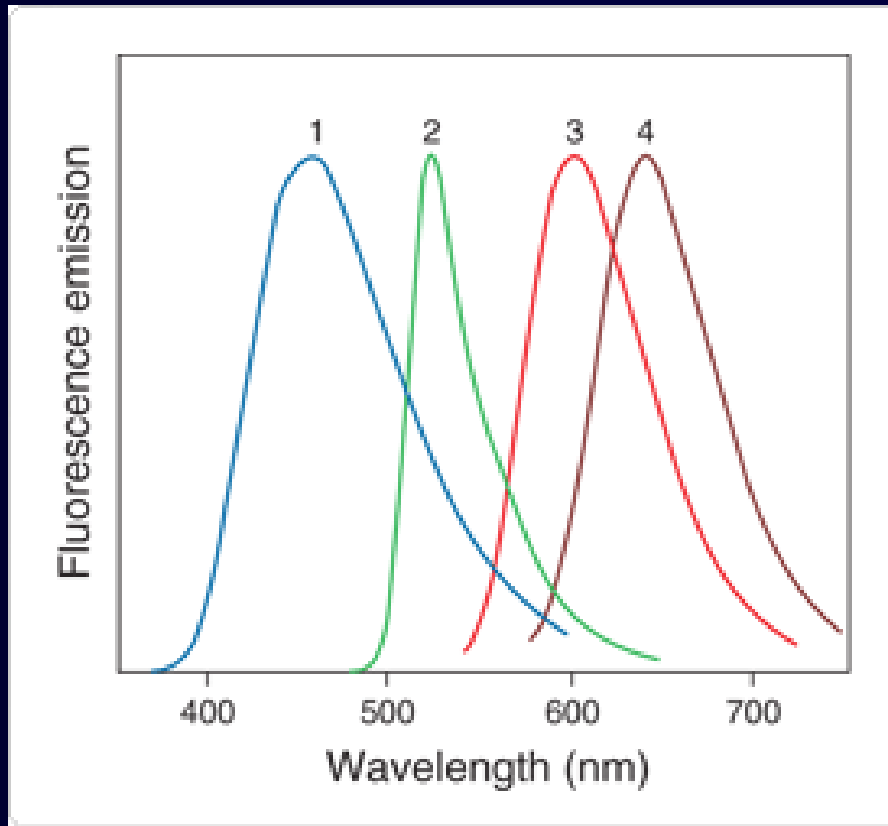


ethidium bromide

Hoechst 33258



- interkalační sondy - ethidium bromide, propidium iodide, 7-AAD (aminoactinomycin D)
- vazba do malého žlábků – DAPI, Hoechst dyes (33342, 33258)
- ostatní – akridinová oranž (DNA) akridinová oranž (RNA)

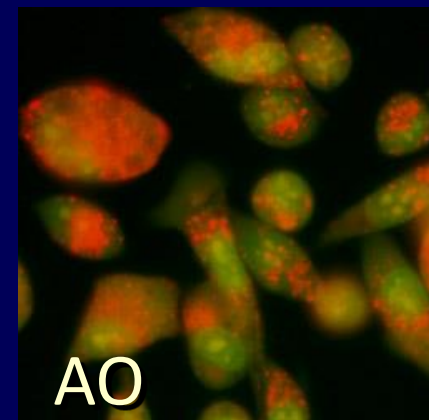
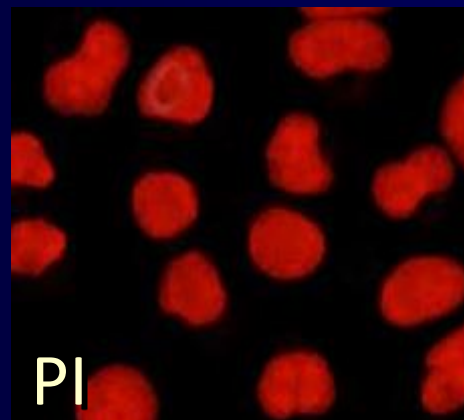
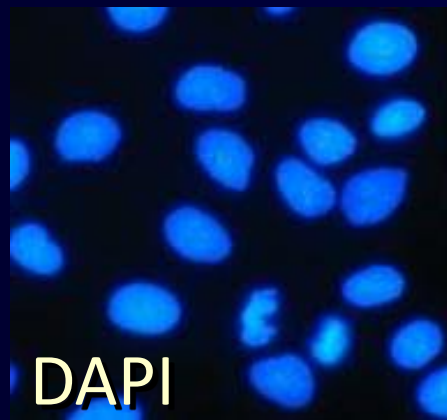


Normalizovaná fluorescenční emisní spektra DNA sond

- 1) Hoechst 33258 (~DAPI)
- 2) acridine orange
- 3) ethidium bromide
- 4) 7-aminoactinomycin D

Fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny

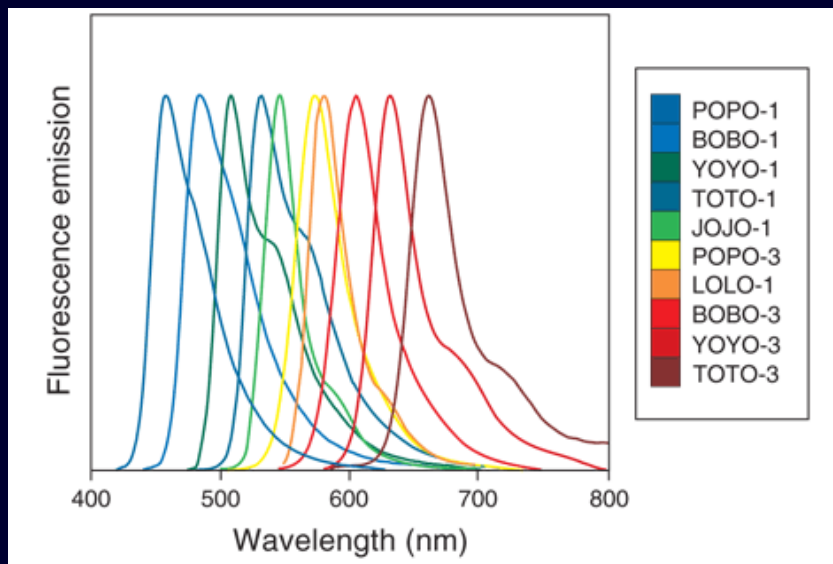
fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	použití
Akridinová oranž (DNA)	500	526	prostupuje; RNA/DNA; průtoková cytometrie
Akridinová oranž (RNA)	460	650	
Ethidium bromid	518	605	neprostupuje; vmezeřování do dsDNA; barvení mrtvých buněk; elektroforéza; průtoková cytometrie; ...
Propidium jodid	535	617	neprostupuje; barvení mrtvých buněk
DAPI	358	461	částečně prostupuje; buněčný cyklus; AT-selektivní; ...
Hoechst 33342	350	461	prostupuje; AT-selektivní; selektivní vazba k dsDNA; buněčný cyklus; ...



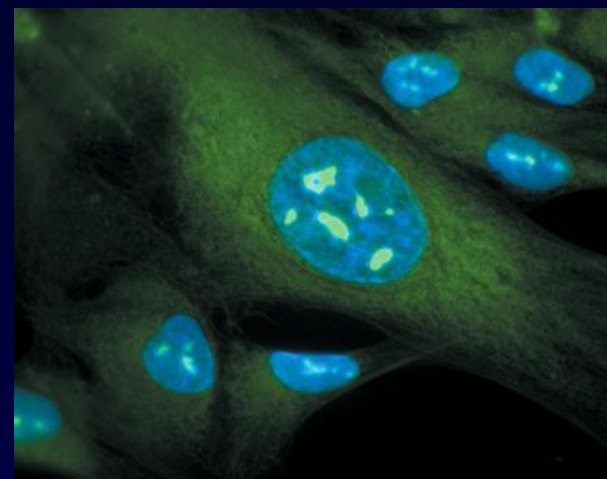
cyaninové sondy (Molecular Probes)

- nízká vnitřní fluorescence (QY=0,01) bez vazby na NK
- po vazbě na NK 1000x zvýšená intenzita (QY=0,9)
- vysoká afinita pro NK
- minimální vazba na ostatní biopolymery
- široký rozsah emisních maxim

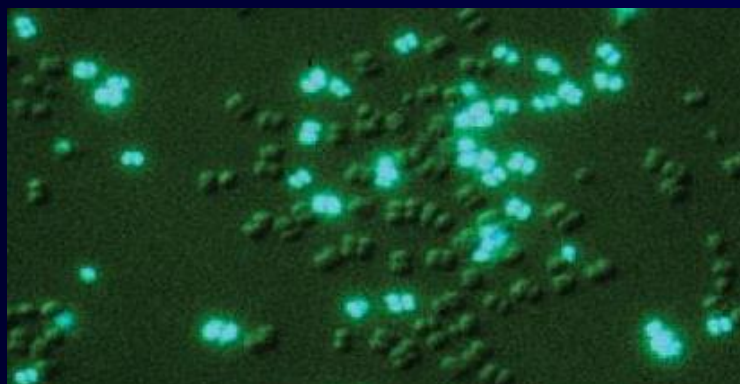
- dělení dle propustnosti pl. membrány
- neprostupující: TOTO family, TO-PRO family, SYTOX
- prostupující : SYTO (RNA i DNA specificita)



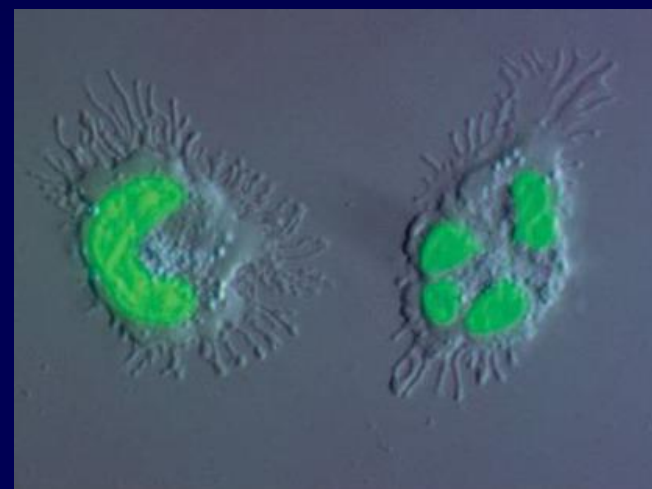
emisní spektra skupiny TOTO



linie MRC-5, RNA
SYTO® RNaselect™



směs živých a mrtvých bakterií,
DNA, SYTOX® Blue



lidský neutrofil, DNA,
SYTO® 13

